



**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer**  
**WO 02/36794 A1**

(71) **Anmelder (nur für US): STECKHAN, Christiane** (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]: Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). **STECKHAN, Uwe** (Erbe des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]: Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). **STECKHAN, Antje** (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]: Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). **STECKHAN, Heike** (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]: Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE).

(72) Erfinder: STECKHAN, Eberhard (verstorben).

(72) **Erfinder; und**  
(75) **Erfinder/Anmelder** (*nur für US*): LÜTZ, Stephan [DE/DE]; An Haus Vendel, 50321 Brühl (DE). WANDREY, Christian [DE/DE]; Wolfshovener Strasse 139,

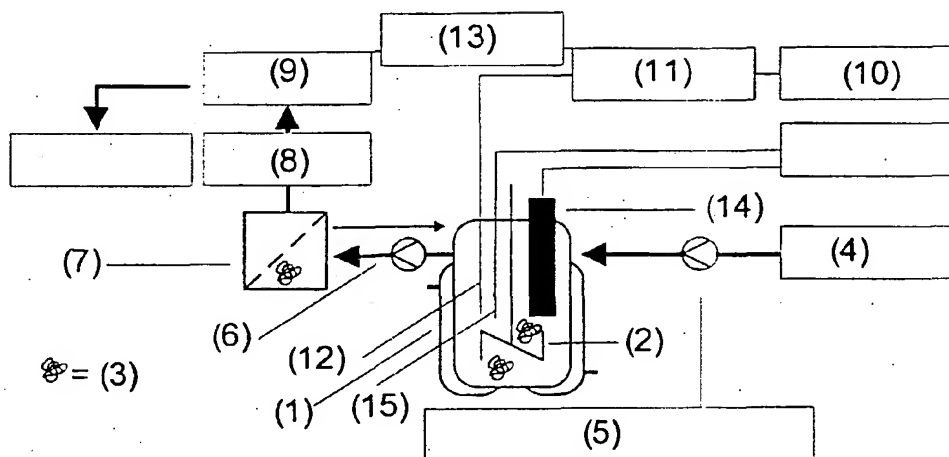
(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): LÜTZ, Stephan [DE/DE]; An Haus Vendel, 50321 Brühl (DE). WANDREY, Christian [DE/DE]; Wolfshovener Strasse 139,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN OXIDATION VON SUBSTRATEN MIT  $H_2O_2$



**WO 02/36794 A1**

BNSDOCID: &lt;WO\_\_0236794A1\_I&gt;



52428 Jülich (DE). LIESE, Andreas [DE/DE]; Brockmüllerstrasse 15, 52428 Jülich (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Personal und Recht-Patente (PR-PT), 52425 Jülich (DE).

(81) Bestimmungsstaat (*national*): US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten  
mit  $H_2O_2$ 

---

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten mit  $H_2O_2$  nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

5 Bei der oxidativen Synthese insbesondere von organischen Zielverbindungen werden Substrate häufig mit  $H_2O_2$  oxidiert. Bei diesen Reaktionen werden auch Katalysatoren eingesetzt, welche zu Produkten der gewünschten Regio- oder Stereoselektivität führen. Bei der stereoselektiven organischen Synthese spielen insbesondere Enzyme als Katalysatoren eine wichtige Rolle.

10 Sulfoxide sind zum Beispiel wertvolle chirale Bausteine, die durch katalytische Synthese hergestellt werden können. Sie können in einer Vielzahl asymmetrischer, chemischer Synthesen als chirales Auxiliar oder dirigierende Gruppe eingesetzt werden. Ebenso können sie Bestandteil von Wirkstoffen in der Pharmazie sein.

15 Chemische Synthesen für chirale Sulfoxide sind bereits zahlreich beschrieben (Kagan, H. et al. (1990), Synlett 11: 643-650). Wie allgemein in der Herstellung chiraler Verbindungen, sind auch zur Synthese von Sulfoxiden Biotransformationen eingesetzt worden (Holland, H. et al. (1999), J. Mol. Catal. B. 6: 463-471), insbesondere Haloperoxidasen: z. B. vanadiumhaltige Bromoperoxidasen

20

(Allenmark, S. et al. (1998), Tetrahedron 54: 15293-15304; Allenmark, S. et al. (2000), Biocatalysis and Biotransformation 18: 79-86). Wegen ihrer Selektivität  
5 interessant ist Chloroperoxidase aus *Leptoxylum fuma-*  
go. So setzt sie im Gegensatz zu anderen Peroxidasen  
Arylalkylsulfide bevorzugt zum (R)-Sulfoxid um, während  
andere Peroxidasen das (S)-Produkt bilden (Allenmark et  
al. (1996), Tetrahedron: Asymmetry 7: 1089-1094;  
Sheldon, R. (1997), Tetrahedron 53: 13813-13220).  
10 Hierbei werden mit einer Reihe von Arylalkylsulfiden  
und Alkylalkylsulfiden hohe Ausbeuten und hohe optische  
Reinheiten erzielt.

Ein großes Problem bei allen bisher bekannten Umsetzun-  
gen mit Chloroperoxidase und anderen enzymatischen und  
15 nicht enzymatischen Katalysatoren ist jedoch deren  
rasche Desaktivierung durch das Oxidationsmittel.  
Meistens wird hierbei Wasserstoffperoxid verwendet. Die  
Reaktionsparameter sind bereits für die Oxidation ver-  
schiedener Sulfide mittels Chloroperoxidase optimiert  
20 worden (Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bio-  
engineering 55: 283-288). Nach der Verfahrensweise von  
Deurzen bietet es sich an, bei einem pH-Wert von 5 (Ka-  
liumphosphat-Puffer 100 mM) und einer Temperatur von  
25 °C zu arbeiten. Es werden 30 Volumen-% tert-Butanol  
25 als Cosolvens verwendet. Für ein kontinuierliches Ver-  
fahren wird hierbei eine sensorgesteuerte Wasserstoff-  
peroxid-Dosierung verwendet, die eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentra-  
tion von 50 µM ermöglicht.

30 Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einer zeitabhängigen Ak-  
tivitätsmessung der Chloroperoxidase in einem für die

Sulfoxidation relevanten Puffersystem bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von nur 50  $\mu$ M unter den von Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bioengineering 55: 283-288, beschriebenen Bedingungen.

5

Bedingt durch die rasche Desaktivierung des Enzyms im o.g. Puffersystem konnten zwar Umsetzungen durchgeführt werden, jedoch mit einer geringen Reaktionsstabilität des Biokatalysators. Die Reaktionsstabilität kann als maximale Zykluszahl angegeben werden (ttn, engl. total turnover number = Stoffmenge Produkt / Stoffmenge verbrauchtes Enzym). Einige Ergebnisse zeigt Tabelle 2, für die ebenfalls die Reaktionsbedingungen von Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bioengineering 55: 283-288, gelten.

10

15

Bekannt ist, daß zur Erhöhung der Reaktionsstabilität eine in situ Erzeugung von Wasserstoffperoxid beiträgt. Hierzu sind zwei Ansätze bekannt. Zum einen ein Verfahren, bei dem Sauerstoff mit chemischen Mitteln reduziert wird (Sheldon, R. et al. (1999), J. Mol. Catal. B 6: 453-461), wobei jedoch stets eine stöchiometrische Menge Nebenprodukt anfällt. Ebenso kann Wasserstoffperoxid durch die Oxidation von Glucose mit Sauerstoff und Glucose Oxidase durchgeführt werden (US Patent 4,284,723); die Enzyme können auch coimmobilisiert werden (Sheldon, R. et al. (2000), Biotechnology and Bioengineering 69: 286-291), was jedoch einen hohen verfahrenstechnischen Aufwand darstellt und ebenso kostenintensive Nebenreaktionen bei leicht erhöhter Stabilität um den Faktor 2 in Kauf nimmt. Bei der

20

25

30

chemischen in situ Erzeugung von  $H_2O_2$  wird aus stöchiometrischen Gründen stets eine relativ hohe Konzentration an  $H_2O_2$  gebildet, welche bei empfindlichen Katalysatoren oder Enzymen zu einer schnellen Desaktivierung führt.

Es ist daher die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur katalytischen Oxidation von Substraten mittels  $H_2O_2$  zu schaffen, bei dem die Aktivität des Katalysators nicht durch das  $H_2O_2$  herabgesetzt wird, die Aktivität des Katalysators also über lange Reaktionszeiträume konstant erhalten bleibt und welches kostengünstig und nicht aufwendig in der Verfahrensweise ist. Als Katalysator im Sinne der Erfindung ist ein Enzym zu verstehen, welches ein Substrat umsetzt. Im weiteren Sinne ist darunter aber auch ein Mikroorganismus zu verstehen, welcher das Substrat biokatalytisch mittels eines Enzyms umsetzt.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nunmehr möglich, Substrate in einer für den Katalysator schonungsvollen Weise mit  $H_2O_2$  zu oxidieren. Das Verfahren ist kostengünstig, da auf teure Oxidationsreagenzien verzichtet werden kann. Auf viele Verfahrensschritte kann verzichtet werden, da keine Nebenprodukte gebildet werden, die abgetrennt werden müssen.

Die Figur und die Tabellen zeigen eine mögliche Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens sowie einige Beispiele für den Stand der Technik und erfindungsgemäße Parameter und Ergebnisse.

5

Es zeigt:

- Fig.1: Eine Vorrichtung
- Fig.2: Graphik zum Aktivitätsverlauf nach dem Stand der Technik
- 10 Fig.3: Umsatz- bzw. Aktivitätsverlauf für Beispiel 1.
- Fig.4: Umsatz-Zeitverlauf für Beispiel 2
- Fig.5: Umsatz-Zeitverlauf für Beispiel 3
- Fig.6: Vergleich der ttn-Werte zum Stand der Technik für kontinuierliche Reaktionen nach Beispiel 3
- 15
- Tabelle 1: Aktivitäts-Zeitverlauf nach dem Stand der Technik
- Tabelle 2: Restaktivität für verschiedene Verfahrenstypen nach dem Stand der Technik
- 20
- Tabelle 3a: Liste der Reste  $R_1$  und  $R_2$  für ein erfindungsgemäßes Substrat der allgemeinen Formel  $R_1$ -S- $R_2$
- Tabelle 3b: Substrate, welche durch Chloroperoxidase epoxidiert werden.
- 25
- Tabelle 3c: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Anwesenheit von Halogenidionen.

Tabelle 3d: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Abwesenheit von Halogenidionen.

Tabelle 4: Versuchsergebnisse

5

Tabelle 5: Versuchsergebnisse

Tabelle 6: Versuchsergebnisse

Tabelle 7: Versuchsergebnisse

Im Folgenden soll die Erfindung erläutert werden:

10

Figur 1 zeigt eine für die Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung. Sie besteht aus einem Reaktor 1, der mit einem Rührer 2 ausgestattet ist und in dem sich die Reagenzien und der Katalysator 3 befinden. Der Reaktor 1 besitzt einen Substratzufluß 4, der über eine Regeleinheit 5 gesteuert ist und einen Abfluß 6, der über ein Membranfilter 7 in eine Blasenfalle 8 führt, die mit einem Polarimeter 9 in Verbindung steht, welches als Meßinstrument für die Ausbeute der Reaktion dient. Der Reaktor 1 wird durch einen Sauerstoffvorrat 10 gespeist, der mit einem Massenflußmesser 11 über eine Leitung 12 mit dem Reaktor 1 verbunden ist. Das Polarimeter 9 und der Massenflußmesser 11 sind mit einer Datenverarbeitungsanlage 13 verbunden. In den Reaktor 1 ragen eine Kathode 14 und eine Gegenelektrode 15, die einen Stromeintrag in den Reaktor 1 bewirken. Durch die gezielte Steuerung der Stromstärke kann eine genau an die jeweils vorliegenden Synthesebedingungen angepaßte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsgeschwindigkeit erreicht werden. Die stationäre Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist daher von Anfang an gering, insbesondere dann, wenn die Oberflä-



che der Kathode großflächig ausgebildet ist, so daß die räumliche Verteilung des gebildeten  $H_2O_2$  von Anfang an sehr groß ist. Im Gegensatz zur konventionellen Zudosierung von  $H_2O_2$  in konzentrierten oder bereits verdünnten Lösungen entsteht in keinem Zeitpunkt eine stationäre und oder punktuelle Konzentration, die so hoch ist, daß das Enzym oder der Mikroorganismus, welcher die Umsetzung durchführt, desaktiviert werden kann. Weiterhin wird der Reaktionsprozeß durch das ständige Rühren begünstigt.

Figur 2 zeigt den Zeitverlauf der Aktivität in % für ein Reaktionssystem gemäß Tabelle 1 nach dem Stand der Technik mit

30% tert.-Butanol: Puffergemisch  $t_{1/2} = 36 \text{ min}^{-1}$   $[H_2O_2] = 50 \mu\text{M}$ . Desaktivierungsrate  $1,8\% \text{ min}^{-1}$ .

Abszisse x: Aktivität [%] Chloroperoxidase (CPO)  
Ordinate y: [t/min]

Figur 3 zeigt das Ergebnis für das erfindungsgemäße Beispiel 1:

Ordinate x: Umsatz • von Thioanisol;  
Aktivität o von CPO in [%]  
Abszisse y: Zeit [min]

Figur 4 zeigt das Ergebnis für Beispiel 2:

Abszisse x: Umsatz [%] von Thioanisol  
Ordinate y: Zeit [h]

Figur 5 zeigt das Ergebnis für Beispiel 3:

Abszisse x: Umsatz [%] von Thioanisol

Ordinate y: Zeit [h]

5      Figur 6 zeigt das Ergebnis für Tabelle 5:

Abszisse x: ttn [ $10^3$ ]

Ordinate y: ttn Werte links Stand der Technik,  
rechts erfindungsgemäß

10      Erfindungsgemäß wird nun bei einer katalytischen Oxidation eines Substrates Sauerstoff in die Lösung eingeleitet, welcher durch die Kathode zu  $H_2O_2$  reduziert wird. Die elektrochemische Herstellung des  $H_2O_2$  muß nicht zwingend im Reaktor 1 erfolgen, sondern kann auch  
15      außerhalb des Reaktors stattfinden, wobei das gebildete  $H_2O_2$  anschließend in den Reaktor 1 eingeleitet wird, jedoch ist die  $H_2O_2$ -Herstellung im Reaktor 1 bevorzugt. Erfindungswesentlich ist hierbei, daß das  $H_2O_2$  in einer solchen Konzentration gebildet wird, bzw. in einer solchen  
20      Konzentration vorliegt, daß ein gegenüber  $H_2O_2$  empfindlicher Katalysator nicht desaktiviert wird. Dies ist in der Regel dann der Fall, wenn die Elektrolyse mit  $H_2O_2$ -Produktionsraten durchgeführt wird, die geringer oder gleich sind als die Menge  $H_2O_2$ , die der Katalysator umsetzen kann. In dieser bevorzugten Verfahrensweise ist die Produktionsrate von  $H_2O_2$  maximal so hoch, wie es dem  $K_m$ -Wert des Biokatalysators für die spezifische Reaktion entspricht. Beispielfhaft können Reaktionsbedingungen angegeben werden, bei denen eine  
25      Graphitelektrode einer Oberfläche von  $6 \text{ cm}^2$  eine Strom-  
30

dichte von  $0,1-5 \text{ mAcm}^{-2}$ , oder  $0,3-1,0 \text{ mAcm}^{-2}$  und bei CPO von  $0,5 \text{ mAcm}^{-2}$  in das Reaktionssystem einträgt. Diese Werte sind jedoch nicht beschränkend auszulegen, da die für den Spezialfall günstigste Stromdichte von einer  
5 Vielzahl von Parametern, wie Konzentration der Einzelkomponenten und damit der Geschwindigkeit der Umsetzung und der Instabilität des Enzyms gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  abhängt. Im Allgemeinen gilt jedoch, daß die Elektrolyse am Besten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsraten durchgeführt wird, die  
10 geringer oder gleich sind als die Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die der Katalysator umsetzen kann. Bei der Sulfoxidation kann von einem  $K_m$ -Wert von  $< 100 \text{ } \mu\text{M}$  ausgegangen werden.

Empfindliche Katalysatoren im Sinne der Erfindung sind  
15 Enzyme, die in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  desaktiviert werden. Beispiele hierfür sind Oxidoreduktasen, wie Peroxidasen, NADH-Peroxidase (1.11.1.1.), NADPH-Peroxidase (1.11.1.2.), Fatty acid peroxidase (1.11.1.3.), Myeloperoxidase (1.11.1.7.), Glutathione peroxidase  
20 (1.11.1.9.), L-ascorbate peroxidase (1.11.1.11.), Mangan Peroxidase (1.11.1.13) (die Numerierung entspricht der CPO-Nomenklatur (1.11.1.10), besonders bevorzugt die Haloperoxidasen, Chloroperoxidasen, Bromoperoxidasen, Jodoperoxidasen.

25 In dem erfindungsgemäßen Reaktionssystem können sich auch zwei oder mehrere Katalysatoren bzw. Enzyme befinden, die nebeneinander ablaufende oder in einer Nachfolge ablaufende Reaktionen katalysieren. Die Katalysatoren können sowohl frei in der Lösung vorliegen, als  
30 auch an Festphasen immobilisiert sein. Nach dem Stand der Technik wird die Immobilisierung häufig dann ver-

wendet, wenn ein Katalysator bzw. Enzym kinetisch anfällig gegen Desaktivierung ist, zum Beispiel bedingt durch chemische Reaktion des Katalysators mit einer der im System befindlichen Komponenten. Das erfindungsgemäße Verfahren trägt dazu bei, daß auf eine Immobilisierung an einem Festkörper verzichtet werden kann, zumindest um den Katalysator vor Desaktivierung zu schützen. Es kann jedoch aus anderen verfahrenstechnischen Gründen vorteilhaft sein, eine Immobilisierung an einer Polymermatrix vorzunehmen, da eine Zurückgewinnung des Katalysators so leichter möglich ist.

Die enzymatischen Umsetzungen werden in wäßriger Lösung durchgeführt, jedoch können zur Steigerung der Substratlöslichkeit, insbesondere von organischen Substraten, organische Lösungsmittel als Cosolventien eingesetzt werden, die in Konzentrationen von beispielsweise 1 bis 50% oder vorzugsweise 10 bis 30%, besonders bevorzugt 15%, eingesetzt werden können. Beispielfhaft können Lösungsmittel wie tert.-Butanol, PEG 600, 2-Butanon, Ethylenglykol, 2-Propanol, Aceton, Ethanol, 2-Butanol, PEG 20000, Ethylenglycolmonobuthylester genannt werden.

Die Reaktionsbedingungen für enzymatische Katalysen werden vorzugsweise so gewählt, daß ein pH-Wert von 3-8 vorliegt. Besonders bevorzugte pH-Werte liegen bei 4,5-5,5.

Die günstigsten Reaktionsbedingungen finden sich in einem Temperaturbereich zwischen 5 und 30 °C, besonders bevorzugt sind Reaktionstemperaturen zwischen 15 und 25 °C.

5

Als Substrate können in den Reaktionen die, für die Katalysatoren, entsprechenden Substrate eingesetzt werden. Diese sind grundsätzlich nicht auf einzelne Beispiele beschränkt, jedoch sind in den Tabellen 3a bis d beispielhaft einige Substrate angeführt, die für die Reaktionen eingesetzt werden können. Diese beispielhaft aufgeführten Substrate können zum Beispiel für Reaktionen mit Peroxidasen, allgemeiner Oxidoreduktasen, eingesetzt werden. Natürlich können sie auch bei Enzymreaktionen anderer Enzyme eingesetzt werden, die diese Substrate umsetzen.

15

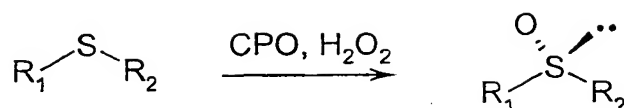
Generell kommen organische Substrate, wie Sulfide, Olefine, Olefinester, aromatische Olefine, Alkine, Cyclopropan, substituiertes Cyclopropan, Sulfoxide, Thiole, Carbonsäuren, Heteroaromaten, Aromaten, halogensubstituierte Aromaten, Phenole, o-, m-, p-alkylsubstituierte Phenole, Anilin, N-Di oder monoalkylsubstituiertes Anilin oder Alkohole in Betracht.

20

25

In einem Ausführungsbeispiel gemäß Formel 1 kann die stereoselektive Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden mittels Chloroperoxidase (E.C.1.11.1.10), die nach einer anderen Nomenklatur mit CAS [9055-20-39] bezeichnet wird, beschrieben werden.

30



Formel 1

5  $\text{R}_1$  = eine Komponente aus der Gruppe Alkyl, Aryl, Phenyl, alkylsubstituiertes Aryl (Tolyl), halogensubstituiertes Aryl- (m-Chlorphenyl, p-Chlorophenyl, m-Bromophenyl-, p-Bromophenyl), m-Methoxyphenyl, p-Methoxyphenyl, p-Nitrophenyl, heterosubstituiertes Aryl (5,6,7-gliedrige aromatische Ringe mit O,S,N, z. B. Thiophen)

10  $\text{R}_2$  = eine Komponente aus der Gruppe Alkyl (Methyl, Ethyl, n-Propyl)

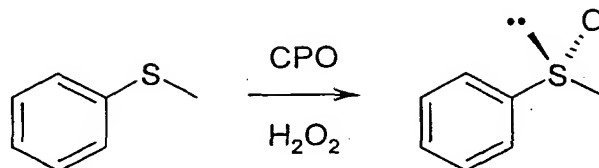
15 Die Substrate können einer Formel aus allen Unterkombinationen von  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  entsprechen oder Verbindungen sein, bei denen  $\text{R}_1 = \text{R}_2$  ist, oder Substrate sein, bei denen  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  Bestandteil eines cyclischen Systems (z.B. Thiochroman, 2,3-Dihydro[b]Benzothiophen) ist.

20 Unter Alkyl sind sowohl für  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  geradkettige als auch verzweigte Kohlenwasserstoffketten zu verstehen, wobei die Komponenten auch mit Heteroatomen, wie z. B. O, N, F, Cl, Br und I substituiert sein können. Beispielfhaft können Methyl, Ethyl, n-Propyl, i-Propyl,

25 t-Butyl genannt werden.

Unter Aryl sind aromatische Systeme, eingeschlossen Heteroaromaten, und substituierte aromatische Systeme zu verstehen.

Beispielhaft kann eine Umsetzung nach Formel 2 angeführt werden.



Formel 2

Überraschend hat sich gezeigt, daß die Chlorperoxidase aus *Leptoxiphium fumago* (E.C. 1.11.1.10) entgegen allen bisherigen Experimenten in der Lage ist, kontinuierlich Oxidationen von Sulfiden durchzuführen, wenn die Bereitstellung des Oxidationsmittels erfindungsgemäß durch kathodische Reduktion von Sauerstoff erfolgt. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine bequeme Einstellung der Dosierate über die Stromdichte, und als Nebenprodukt fällt ausschließlich Wasser an. Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher insbesondere kostengünstig und umweltfreundlich.

Chlorperoxidase ist z. B. in der Lage, Thioanisol (Methylphenylsulfid) bei einer Limitierung der Wasserstoffperoxid-Dosierung durch das erfindungsgemäße Verfahren in einer Konzentration von 3,7 g/L Thioanisol (=20 mM) in einem Volumen von 50 mL innerhalb von 5 Stunden vollständig umzusetzen.

Das Verfahren kann in den üblichen Reaktoren durchgeführt werden, die zusätzlich mit einer Elektrodenanordnung und einer Sauerstoffbegasung versehen sind. So

können z. B. herkömmliche Rührreaktoren in diskontinuierlicher oder kontinuierlicher Betriebsweise eingesetzt werden.

Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens vermindert sich der kostenintensive Katalysatorverbrauch deutlich.

Werden als Biokatalysatoren Mikroorganismen eingesetzt, die die Oxidation des Substrates durch eine enzymatische Reaktion durchführen, so ist es gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls vorteilhaft, daß der Mikroorganismus nicht durch  $H_2O_2$  angegriffen wird. In dem Mikroorganismus kann das Enzym überexprimiert sein.

15

Im folgenden wird die Erfindung anhand von speziellen Beispielen näher beschrieben:

Beispiel 1 : Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im Rührreaktor

20

Chloroperoxidase wurde käuflich erworben (z. B. Sigma C-0287), in Puffergemisch gelöst (Kaliumphosphat 0,1 M; pH 4,5; 30 Vol% t-BuOH), Thioanisol zugegeben, die Lösung mit Sauerstoff begast und die Umsetzung durch Elektrolyse gestartet.

25

Ansatz: 5 mL Reaktionsvolumen

0,1 mmol Thioanisol

15 U Chloroperoxidase (0,28 nmol)

30

Nach 10, 20, 35 und 55 Minuten wurden jeweils Proben entnommen und mittels gaschromatographischer



(GC-) Analyse der Gehalt an restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt (Fig.3).

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

5 Kapillarsäule: HP1 (Länge 12 m,  $\varnothing=0,25$  mm), Trägergas: Stickstoff, Injektor: Split, 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur: 60 °C (0,5 min), 20 °C·min<sup>-1</sup>, 200 °C (2 min)

10 Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß das eingesetzte Sulfid nach 40 Minuten praktisch vollständig zum Sulfoxid umgesetzt worden ist.

15 Nach der Umsetzung wurden noch 73% Enzymaktivität wiedergefunden, was einer ttn von 360.000 entspricht (Faktor 2,4 gegenüber bekannten Verfahren).

20 Beispiel 2 : Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im Rührreaktor mit Produktextraktion im repetitive batch

Verfahren gemäß Beispiel 1. Nach vollständiger Umsetzung wird das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert, neues Substrat zugegeben und die Elektrolyse fortgesetzt.

Ansatz: 50 mL Reaktionsvolumen

4\*1 mmol Thioanisol

50 U Chloroperoxidase (0,93 nmol)

30 Die Elektrolyse wird nach entsprechendem Ladungsfluß unterbrochen, Proben entnommen und mittels gaschroma-

tographischer (GC-) Analyse der Gehalt an restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt. Die verschiedenen Versuchsläufe sind in Fig. 4 dargestellt. Der Ladungsfluß pro Lauf betrug 193 C (Coulomb).

5

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

Kapillarsäule: HP1 (Länge 12 m,  $\varnothing=0,25$  mm), Trägergas: Stickstoff, Injektor: Split, 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur: 60 °C (0,5 min),  
20 °C·min<sup>-1</sup>, 200 °C (2 min)

10

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß das jeweils eingesetzte Sulfid nach maximal 360 Minuten praktisch vollständig zum Sulfoxid umgesetzt worden ist.

15

Zwischen Lauf 2 und Lauf 3 war die Reaktion unterbrochen. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren konnte eine enorme Stabilitätssteigerung der Chloroperoxidase erzielt werden (Umsetzung über 29 Stunden), wobei eine ttn von 1.100.000 erreicht werden kann (Faktor 7 gegenüber bekannten Verfahren).

20

Beispiel 3: Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im kontinuierlichen Rührreaktor

25

Chloroperoxidase wurde käuflich erworben (z. B. Sigma C-0287), in Puffergemisch gelöst (Kaliumphosphat 0,1 M; pH 4,5; 30 Vol% t-BuOH), Thioanisol zugegeben, die Lösung mit Sauerstoff begast und die Umsetzung durch

30

Elektrolyse (Arbeitselektrode Graphit ( $9 \text{ cm}^2$ ), galvanostatisch  $0,4 \text{ mA/cm}^2$ ) gestartet. Der hierzu verwendete Reaktor ist in Figur 1 skizziert.

5        Ansatz:    50 mL Reaktorvolumen  
                 1L 20 mmol Thioanisol in Puffergemisch  
                 400 U Chloroperoxidase (7 nmol)

Der Reaktorauslauf wird fraktioniert gesammelt und mittels gaschromatographischer (GC-) Analyse der Gehalt an  
10        restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt.

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

Kapillarsäule : Cyclodex  $\beta$ -1P (Länge 50 m,  
 $\varnothing = 0,32 \text{ mm}$ ), Trägergas: Helium, Injektor: Split,  
15        200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur 40 °C  
                 (5 min), 20 °C·min<sup>-1</sup>, 160 °C (5 min)

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß nach der Anlaufphase ein kontinuierlicher Umsatz von ~ 50 % erreicht wird.  
20

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten kontinuierliche Umsetzungen über einen Zeitraum von 65 Stunden durchgeführt werden, was gegenüber der anfangs (Tab. 1)  
25        gezeigten starken Desaktivierungsrate eine erhebliche Verbesserung darstellt. Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet zum ersten Mal eine kontinuierliche stereoselektive Oxidation von Sulfiden mit Chloroperoxidase ohne signifikante Desaktivierung. Die Reaktionsstabilität (ttn 260.000) konnte um den Faktor 14 gegenüber  
30

kontinuierlichen Verfahren mit herkömmlicher Dosier-  
technik gesteigert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können stationäre  
Konzentrationen von weniger als 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erzeugt wer-  
den. Auch wenn die in die Reaktionslösung eingetragene  
Ladungsmenge zu einer stationären Konzentration von  
50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  führt, die nach dem Stand der Technik eben-  
falls erreicht wird, ist die Desaktivierung des Enzyms  
unterbunden, so daß für das erfindungsgemäße Verfahren,  
selbst bei gleicher stationärer Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$   
wie bei dem Stand der Technik, ein besseres Ergebnis,  
das heißt keine Desaktivierung des Enzyms beobachtet  
wird.

Die Verbesserungen durch diese neue Methode sind in Ta-  
belle 7 zusammengefaßt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die  
stereoselektive Synthese von organischen Verbindungen  
geeignet, da mit ihm die Ausbeute an enantiomerenreinem  
Produkt nicht gemindert wird, und der Vorteil der enzy-  
matischen Reaktion gegenüber anderen nicht enantiose-  
lektiven Methoden erhalten bleibt. Es kann somit bevor-  
zugt zur Synthese chiraler Produkte und anderer Wert-  
stoffe eingesetzt werden.

Tabelle 1: Zeitabhängige Aktivitätsbestimmung der Chloroperoxidase bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 50  $\mu$ M

| Zeit<br>(min) | rel. Aktivität<br>(%) |
|---------------|-----------------------|
| 0             | 100                   |
| 10            | 79,2                  |
| 20            | 73,6                  |
| 30            | 56,8                  |
| 40            | 52,8                  |
| 50            | 36,8                  |
| 60            | 27,2                  |

Tabelle 2: Reaktionsstabilität der Chloroperoxidase für die Sulfoxidation

| Reaktionsführung | ttn     | Restaktivität |
|------------------|---------|---------------|
| Batch            | 148.000 | 5 %           |
| Fed-Batch        | 145.000 | 0 %           |
| kontinuierlich   | 19.200  | -             |

Tabelle 3a: Liste der Reste  $R_1$  und  $R_2$  für ein erfindungsgemäßes Substrat der allgemeinen Formel  $R_1-S-R_2$

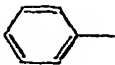


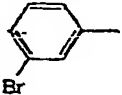
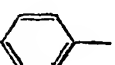

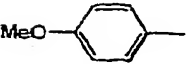

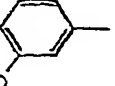
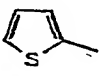
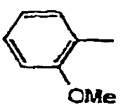
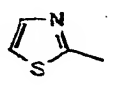
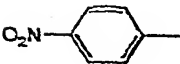
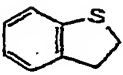

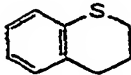
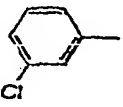
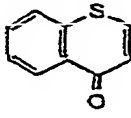
| $R_1$   | $R_2$          | $R_1$   | $R_2$      | cyclisches Sulfi  |
|---|----------------|---|------------|---|
|    | $CH_3$         |    | $CH_2$     |   |
|    | $CH_2CH_3$     |    | $CH_3$     |   |
|    | $CH_2CH_2CH_3$ |    | $CH_2CH_3$ |   |
|    | $CH_3$         |    | $CH_2CH_3$ |   |
|   | $CH_3$         |   | $CH_2$     |   |
|  | $CH_3$         |  | $CH_3$     |   |
|  | $CH_3$         |   |            |  |
|  | $CH_3$         |   |            |  |
|  | $CH_2$         |   |            |  |

Tabelle 3b: Substrate, welche durch Chloroperoxidase  
epoxidiert werden

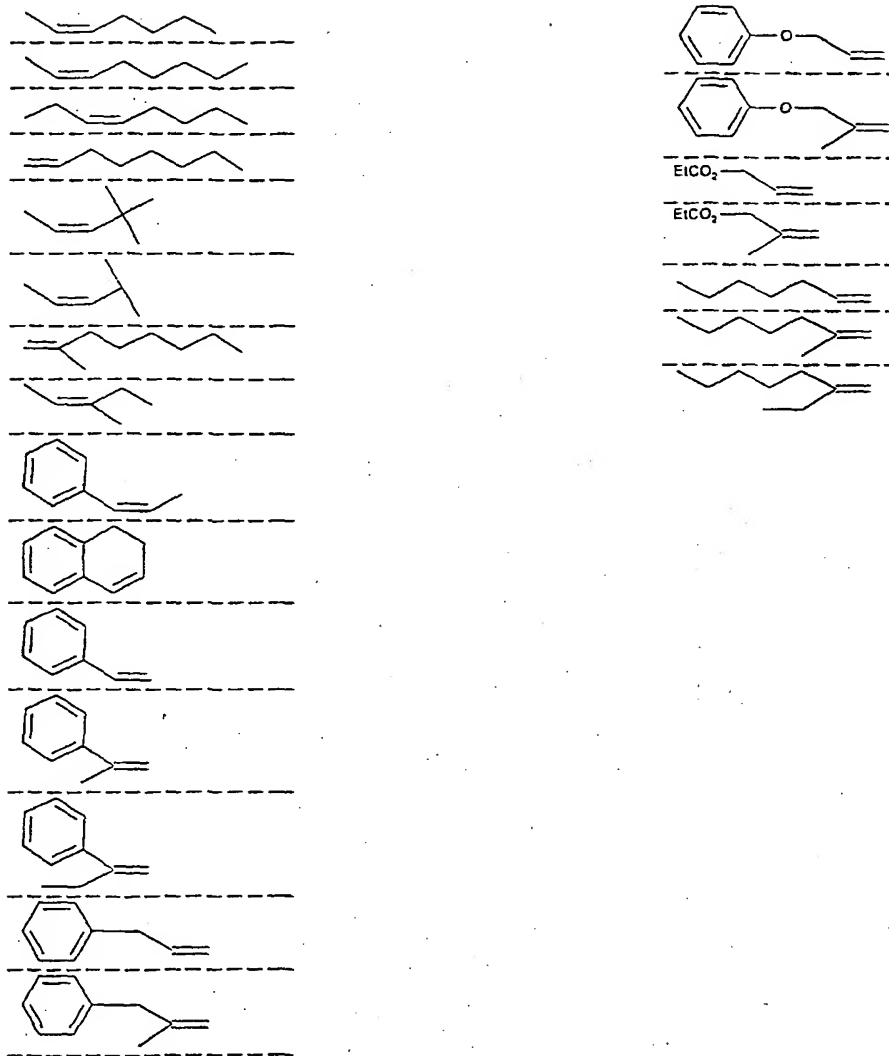


Tabelle 3c: Beispiele für Substrate bei der chloropero-  
xidasekatalysierten Reaktion bei Anwesen-  
heit von Halogenidionen

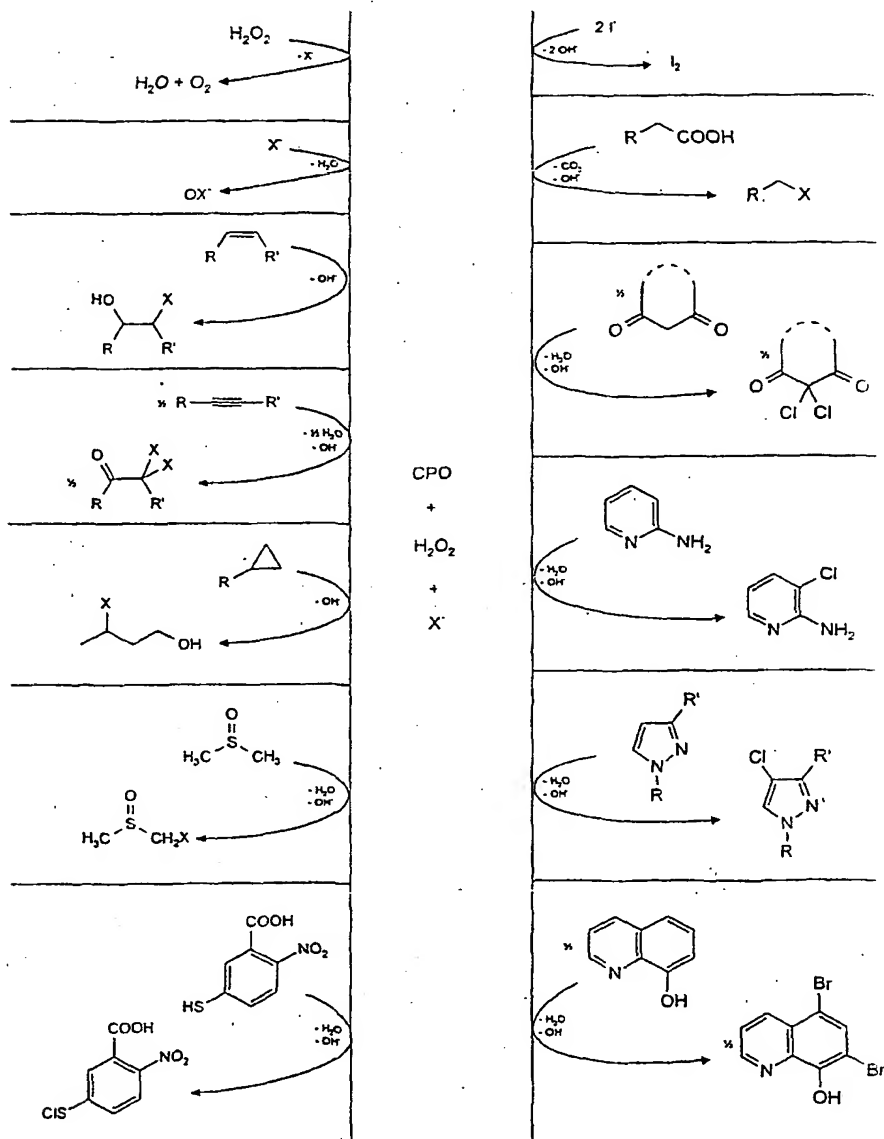




Tabelle 3d: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Abwesenheit von Halogenidionen

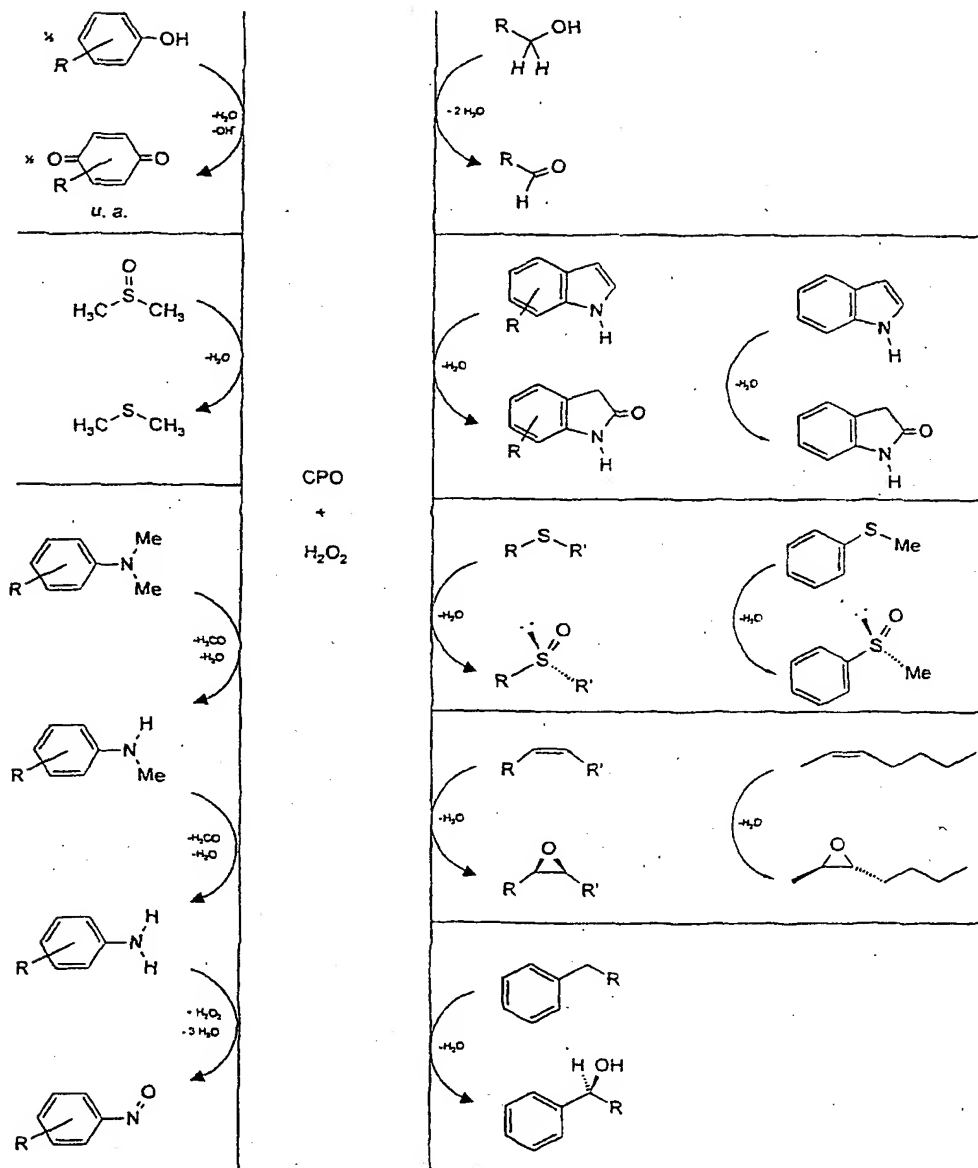


Tabelle 4: Zeitabhängigkeit der Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase

| Zeit<br>(min) | Thioanisol<br>(%) | Methylphenylsulfoxid<br>(%) |
|---------------|-------------------|-----------------------------|
| 0             | 100               | 0                           |
| 10            | 68                | 32                          |
| 20            | 56                | 44                          |
| 35            | 15                | 85                          |
| 55            | 0                 | 100                         |

Tabelle 5: Zeitabhängigkeit der Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase im repetitive batch

| Lauf | Zeit<br>(min) | Thioanisol<br>(%) | Methylphenylsulfoxid<br>(%) |
|------|---------------|-------------------|-----------------------------|
| 1    | 0             | 100               | 0                           |
|      | 350           | 15                | 85                          |
| 2    | 400           | 84                | 16                          |
|      | 720           | 5                 | 95                          |
| 3    | 1000          | 92                | 8                           |
|      | 1270          | 1                 | 99                          |
| 4    | 1400          | 89                | 11                          |
|      | 1720          | 1                 | 99                          |

Tabelle 6: Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase im kontinuierlichen Reaktor

| Zeit<br>(h) | Thioanisol<br>(%) | Methylphenylsulfoxid<br>(%) |
|-------------|-------------------|-----------------------------|
| 0           | 100               | 0                           |
| 5           | 65                | 35                          |
| 11          | 47                | 53                          |
| 15          | 45                | 55                          |
| 21          | 48                | 62                          |
| 25          | 47                | 63                          |
| 31          | 47                | 53                          |
| 35          | 50                | 50                          |
| 41          | 45                | 55                          |
| 45          | 49                | 51                          |
| 51          | 46                | 54                          |
| 55          | 30                | 70                          |
| 61          | 33                | 67                          |
| 65          | 52                | 48                          |

Tabelle 7: Vergleich der kontinuierlichen Verfahren  
zur Sulfoxidsynthese mit Chloroperoxidase

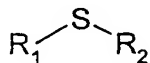
| Verfahren   | ttn    | CPO-Dosierung<br>U /h |
|-------------|--------|-----------------------|
| herkömmlich | 19000  | 590                   |
| Erfindung   | 260000 | 0                     |

## P a t e n t a n s p r ü c h e

- 
1. Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substra-  
ten mit  $H_2O_2$ ,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß das Substrat mittels mindestens eines Katalysa-  
tors mit auf elektrochemischem Wege erzeugtem  $H_2O_2$   
umgesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der ein  
Enzym beinhaltet.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß als Enzym eine Oxidoreduktase eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3;  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß als Oxidoreduktase eine Peroxidase eingesetzt  
wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 daß als Peroxidase eine Haloperoxidase eingesetzt  
wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Haloperoxidase mindestens eine Komponente  
aus der Gruppe Chloroperoxidase, Bromoperoxidase  
5 und Jodoperoxidase eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Chloroperoxidase (E.C.1.11.1.10) aus *Lepto-*  
10 *xyphium fumago* eingesetzt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Substrat ein organisches Substrat einge-  
15 setzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als organisches Substrat eine Komponente aus  
20 der Gruppe der Sulfide, Olefine, Olefinester, aro-  
matische Olefine, Alkine, Cyclopropan, substituier-  
tes Cyclopropan, Sulfoxide, Thiole, Carbonsäuren,  
Heteroaromaten, Aromaten, halogensubstituierte Aro-  
maten, Phenole, o-, m-, p-alkylsubstituierte Phenole,  
25 Anilin, N-Di oder monoalkylsubstituiertes Anilin o-  
der Alkohole eingesetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Substrat ein Sulfid der Formel 1



5

eingesetzt wird, bei dem R<sub>1</sub> Alkyl oder Aryl, Heteroaryl, substituiertes Aryl ist und R<sub>2</sub> Alkyl ist.

- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Alkylrest ein Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-,  
i-Propyl-, t-Butylrest ist.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Alkylrest durch Heteroatome wie O, N, F,  
Cl, Br, und J substituiert ist.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch kathodische Reduktion in situ erzeugt  
wird.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktionsgeschwindigkeit höchstens so  
hoch ist, wie es dem K<sub>m</sub>-Wert des Biokatalysators  
entspricht.

30

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,  
dadurch gekennzeichnet;  
daß die Reaktion bei einem pH-Wert zwischen 3 und 8  
durchgeführt wird.

5

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Reaktionslösung ein organisches Lösungsmittel  
beigemischt ist.

10

17. Verfahren nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als organisches Lösungsmittel tert.-Butanol  
verwendet wird.

15

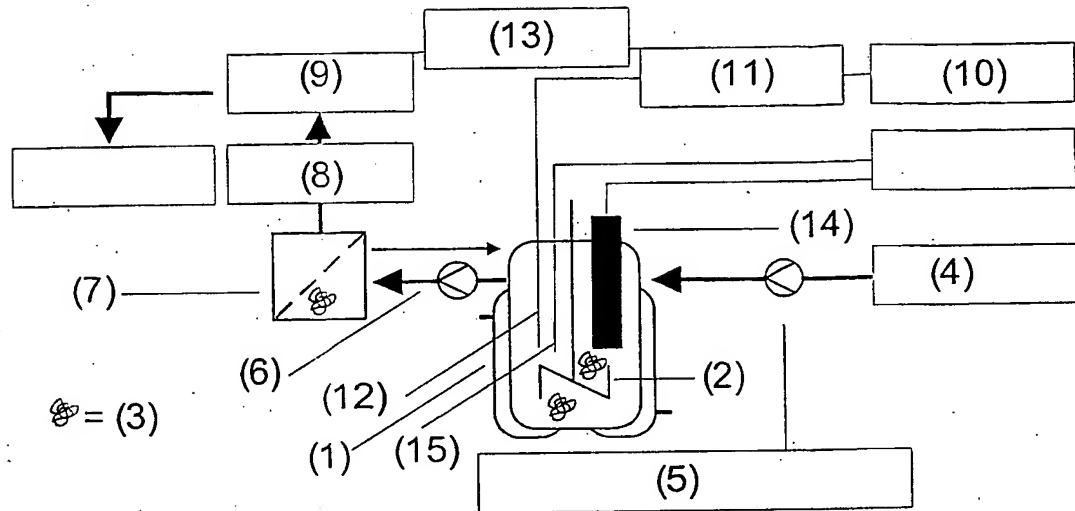
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Reaktion bei einer Temperatur von 5 bis  
30 °C durchgeführt wird.

20

19. Verfahren nach Anspruch 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Reaktion bei einer Temperatur von 15 bis  
25 °C durchgeführt wird.

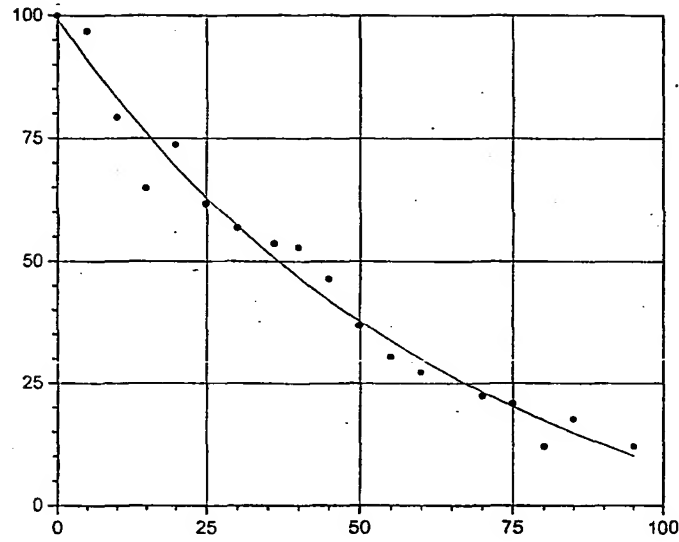


1/4

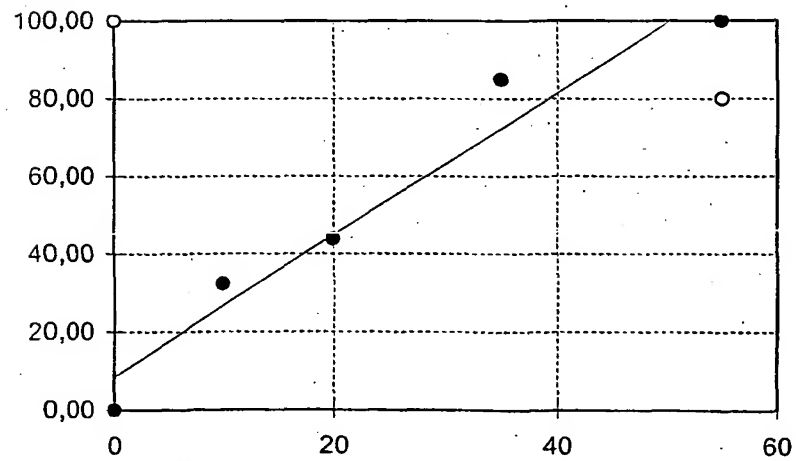


Figur 1

2/4

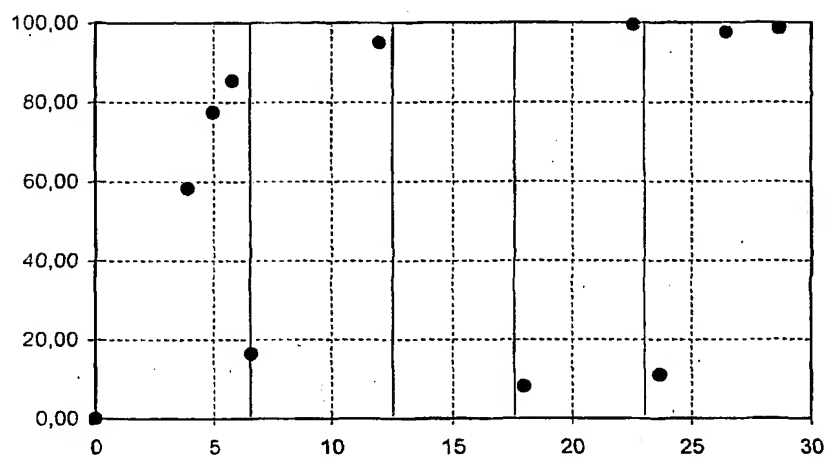


Figur 2

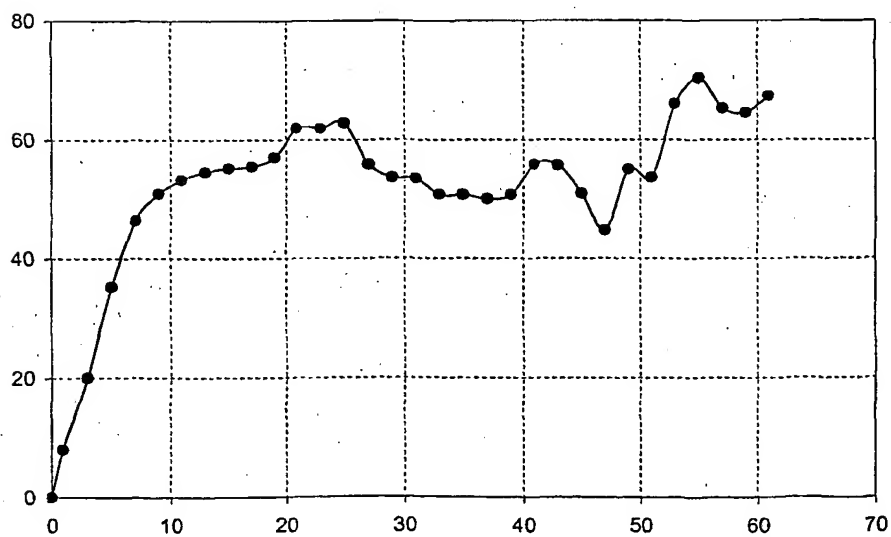


Figur 3

3/4

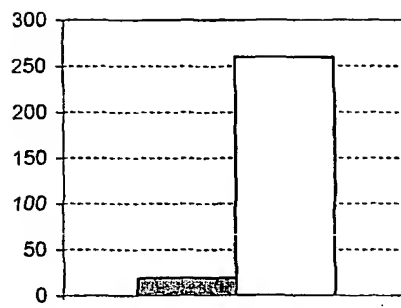


Figur 4



Figur 5

4/4



Figur 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/DE 01/04107

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P7/00 C12P1/00 //C12N9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | BARTLETT, PN ET AL.: "Approaches to the Integration of Electrochemistry and Biotechnology II. The Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by Electrogenerated Hydrogen Peroxide"<br>JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, vol. 146, no. 3, 1999, pages 1088-1092, XP002191300 | 1-4                   |
| Y          | page 1090 -page 1092<br>the whole document<br>---<br>-/--   | 5-19                  |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 2002

Date of mailing of the international search report

04/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ☐ International Application No

PCT/DE 01/04107

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | CHEN JK & NOBE K: "Oxidation of Dimethylaniline by Horseradish Peroxidase and Electrogenenerated Peroxide. I. Free Enzyme Studies"<br>J ELECTROCHEM SOC,<br>vol. 140, no. 2, February 1993 (1993-02),<br>pages 299-303, XP001064971<br>the whole document  | 1-4                   |
| Y          | VAN DE VELDE, F ET AL.: "Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase"<br>BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING,<br>vol. 69, no. 3,<br>5 August 2000 (2000-08-05), pages 286-291,<br>XP002191301<br>cited in the application<br>the whole document  | 1-19                  |
| Y          | SEELBACH, K ET AL.: "Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed"<br>BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING,<br>vol. 55, no. 2, 20 July 1997 (1997-07-20),<br>pages 283-288, XP002191302<br>cited in the application<br>page 286; table 1   | 1-19                  |
| A          | WO 96 06909 A (DEGUSSA ; LAATSCH HARTMUT (DE); SCHRAPEL THOMAS (DE); BERKESSEL ALB)<br>7 March 1996 (1996-03-07)<br>claims 1-5   | 1-19                  |
| A          | COLONNA, S ET AL: "Recent biotechnological developments in the use of peroxidases"<br>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER,<br>AMSTERDAM, NL,<br>vol. 17, no. 4, April 1999 (1999-04),<br>pages 163-168, XP004162835<br>ISSN: 0167-7799<br>the whole document   | 1-19                  |
| A          | D. PLETCHER: "Electrogenenerated Hydrogen Peroxide - From History to New Opportunities"<br>WATTS NEW, A NEWSLETTER FROM<br>ELECTROSYNTHESIS COMPANY, 'Online!<br>vol. 4, no. 1, January 1999 (1999-01),<br>XP002191684<br>Lancaster, NY, USA<br>Retrieved from the Internet:<br><URL:www.electrosynthesis.com/news/w7content.html> 'retrieved on 2002-02-28!<br>the whole document | 1-19                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/04107

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9606909                                | A | 07-03-1996          | DE 4430327 C1              | 09-05-1996          |
|   |   |                     | AU 3472495 A               | 22-03-1996          |
|   |   |                     | WO 9606909 A2              | 07-03-1996          |
|   |   |                     | EP 0777718 A2              | 11-06-1997          |
|   |   |                     | TR 960173 A2               | 21-06-1996          |
| <hr/>                                     |   |                     |                            |                     |

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C12P7/00 C12P1/00 //C12N9/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

#### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

#### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Beitr. Anspruch Nr. |
|------------|---|---------------------|
| X          | BARTLETT, PN ET AL.: "Approaches to the Integration of Electrochemistry and Biotechnology II. The Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by Electrogenerated Hydrogen Peroxide"<br>JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY,<br>Bd. 146, Nr. 3, 1999, Seiten 1088-1092,<br>XP002191300 | 1-4                 |
| Y          | Seite 1090 -Seite 1092<br>das ganze Dokument<br>-----<br>-/-  | 5-19                |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. März 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/04/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bucka, A



| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN |  |                    |
|--|--|--------------------|
| Kategorie*   | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
| X  | CHEN JK & NOBE K: "Oxidation of Dimethylaniline by Horseradish Peroxidase and Electrogenenerated Peroxide. I. Free Enzyme Studies"<br>J ELECTROCHEM SOC,<br>Bd. 140, Nr. 2, Februar 1993 (1993-02),<br>Seiten 299-303, XP001064971<br>das ganze Dokument   | 1-4                |
| Y  | VAN DE VELDE, F ET AL.: "Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase"<br>BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING,<br>Bd. 69, Nr. 3,<br>5. August 2000 (2000-08-05), Seiten<br>286-291, XP002191301<br>in der Anmeldung erwähnt<br>das ganze Dokument   | 1-19               |
| Y  | SEELBACH, K ET AL.: "Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed"<br>BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING,<br>Bd. 55, Nr. 2, 20. Juli 1997 (1997-07-20),<br>Seiten 283-288, XP002191302<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 286; Tabelle 1   | 1-19               |
| A  | WO 96 06909 A (DEGUSSA ;LAATSCH HARTMUT (DE); SCHRAPEL THOMAS (DE); BERKESSEL ALB)<br>7. März 1996 (1996-03-07)<br>Ansprüche 1-5   | 1-19               |
| A  | COLONNA, S ET AL: "Recent biotechnological developments in the use of peroxidases"<br>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER,<br>AMSTERDAM, NL,<br>Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04),<br>Seiten 163-168, XP004162835<br>ISSN: 0167-7799<br>das ganze Dokument   | 1-19               |
| A  | D. PLETCHER: "Electrogenenerated Hydrogen Peroxide - From History to New Opportunities"<br>WATTS NEW, A NEWSLETTER FROM<br>ELECTROSYNTHESIS COMPANY, 'Online!<br>Bd. 4, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01),<br>XP002191684<br>Lancaster, NY, USA<br>Gefunden im Internet:<br><URL:www.electrosynthesis.com/news/w7content.html> 'gefunden am 2002-02-28!<br>das ganze Dokument | 1-19               |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In: Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04107

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patendokument |   | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |            | Datum der<br>Veröffentlichung |
|---|---|-------------------------------|-----------------------------------|------------|-------------------------------|
| WO 9606909  | A | 07-03-1996                    | DE                                | 4430327 C1 | 09-05-1996                    |
|   |   |                               | AU                                | 3472495 A  | 22-03-1996                    |
|   |   |                               | WO                                | 9606909 A2 | 07-03-1996                    |
|   |   |                               | EP                                | 0777718 A2 | 11-06-1997                    |
|   |   |                               | TR                                | 960173 A2  | 21-06-1996                    |
| <hr/>   |   |                               |                                   |            |                               |